



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C08B 37/00, A61K 39/02	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/07178 (43) Date de publication internationale: 15 avril 1993 (15.04.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00955 (22) Date de dépôt international: 9 octobre 1992 (09.10.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/12478 10 octobre 1991 (10.10.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue du Général-Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement) : MOREAU, Monique [FR/FR]; 324, rue Garibaldi, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: TONNELIER, Jean-Claude; Cabinet Nony & Cie, 29, rue Cambacérès, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, CA, FI, HU, JP, KR, NO, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
(54) Title: OLIGOSIDE DERIVED FROM AN ANTIGEN POLYOSIDE OBTAINED FROM A PATHOGENIC AGENT (54) Titre: OLIGOSIDE DERIVE D'UN POLYOSIDE ANTIGENIQUE ISSU D'UN AGENT PATHOGENE (57) Abstract <p>An oligoside derived from an antigen polyoside obtained from a pathogenic agent, a method for its preparation, and its use particularly as a vaccinal agent. The oligoside is prepared by means of an oxidation-reduction depolymerisation reaction.</p> (57) Abrégé <p>Un oligoside dérivé d'un polyoside antigénique issu d'un agent pathogène, son procédé de préparation et son utilisation notamment à titre d'agent vaccinal. L'oligoside est préparé selon une réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brsil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	TG	Togo
DE	Allemagne	ML	Mali	UA	Ukraine
DK	Danemark	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

"Oligoside dérivé d'un polyoside antigénique issu
d'un agent pathogène"

La présente invention a pour objet un oligoside dérivé d'un polyoside antigénique issu d'un agent pathogène, son procédé de préparation et son usage notamment à titre d'agent vaccinal.

Les bactéries ainsi que des champignons tels que des levures incorporent des polyosides dans leur structure de surface. Ainsi la grande majorité des bactéries sont recouvertes d'un exsudat de nature polyosidique qui est fixé à la bactérie de manière plus ou moins forte mais qui n'est pas à proprement parler une enveloppe. Cet exsudat porte le nom de capsule ou de glycocalyx. D'autre part la membrane externe des bactéries gram-négatives est entre autre constituée de lipopolysaccharide (LPS). Enfin, des polysaccharides se retrouvent aussi dans la paroi des champignons. Ces polyosides sont en fait des antigènes de surface qui induisent une réponse immunologique chez un mammifère infecté.

De tels polyosides sont constitués sur la base d'unités répétitives, dans lesquelles les constituants et les liaisons sont définis et qui sont chacune caractéristiques de l'espèce fongique ou bactérienne considérée. Ces unités répétitives contiennent les épitopes, les structures déterminantes de l'antigénicité. A titre d'illustration, on a reporté dans la Figure 1, différents types d'unités répétitives provenant de polyosides capsulaires ou de lipopolysaccharides. Les unités répétitives contiennent souvent des fonctions très labiles telles que par exemple des fonctions phosphates, présentes dans le squelette de la molécule ou en position ramifiée ainsi que, par exemple des groupes O-acétyles et pyruvates.

Un polyoside est en fait constitué d'un ensemble de molécules polymères contenant des unités osidiques en nombre pouvant varier d'une molécule à une autre. Par conséquent, un polyoside ne peut être décrit en terme de poids moléculaire que par un poids moléculaire moyen. Dans le cas d'un homopolyoside, les unités osidiques sont des monosaccharides. Dans le cas d'un hétéropolyoside les unités osidiques forment un enchaînement de constituants liés entre eux de manière définie.

En ce qui concerne le poids moléculaire moyen d'un polyoside, il peut être apprécié par filtration sur gel. Le poids moléculaire est alors exprimé en terme de constante d'élution (K_D) ou d'équivalent dextran (EqD) selon la méthode décrite par Granath et al, J. Chrom. (1967) 28 : 69 que l'on résume
5 comme suit :

Un polyoside en solution est analysé sur une colonne de gel de chromatographie d'exclusion-diffusion qui sépare des éléments en fonction de leur poids moléculaire. Ce type de gel est disponible dans le commerce, par
10 exemple sous les noms commerciaux de Séphadex (Pharmacia), Bio-Gel (Bio-Rad), Fractogel (Toyo-Soda), Sépharose (Pharmacia), et Séphacryl (Pharmacia). La zone de fractionnement du gel doit être bien évidemment adaptée à la gamme des poids moléculaires représentés au sein de la population moléculaire à analyser. A titre d'exemple, on indique que les colonnes de gel de filtration
15 Sepharose 2BCL, 4BCL et 6BCL ont une zone respective de fractionnement déterminée en équivalent dextran de 20.000.000 à 100.000 ; 5.000.000 à 20.000 et 1.000.000 à 10.000. De manière générale, on utilise comme éluant une solution saline, par exemple du chlorure de sodium 0,2 M. Une constante d'élution se calcule selon la formule suivante :

20
$$\frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad \text{dans laquelle}$$

V_e est le volume d'élution de la préparation considérée ; V_t est le volume total de la colonne ; et V_o est le volume mort de la colonne.

25 A titre d'exemple les Figures 2a et 2b présentent les profils d'élution respectifs des polyosides de *Salmonella typhi* et de *Streptococcus pneumoniae* type 1 sur une colonne de Sépharose 4BCL. Le polyoside de *S. typhi* est donc composé de polymères dont les poids moléculaires les plus élevés ne sont pas appréciables sur Sépharose 4BCL. De même, le polyoside de *S. pneumoniae* type
30 1 est essentiellement composé de polymères dont les poids moléculaires varient d'un K_D nul à 0,45. Par définition, la constante d'élution moyenne du polyoside s'apprécie au point d'intersection des tangentes des pentes du profil d'élution ; soit de manière approximative, au sommet du profil d'élution. Ainsi, la constante d'élution moyenne des polyosides présentés aux Figures 2a et 2b est
35 respectivement zéro et 0,04.

Sur la base d'une gamme-étalon établie en utilisant du dextran, on peut convertir une constante d'élution en poids moléculaire exprimé en EqD. A titre d'exemple, la Figure 3 présente un modèle de gamme-étalon.

5

En raison de leur pouvoir antigénique, les polysides, antigènes de surface d'agents pathogènes e.g. bactériens ou fongiques sont de bons candidats à titre d'agent vaccinal. Des vaccins comprenant un extrait polysidique se sont en effet révélés efficaces chez les adultes. Toutefois tel n'est pas le cas chez les jeunes enfants. Afin de surmonter ce désagrément majeur, on a proposé avec succès de lier les polysides de manière covalente à des protéines, ce qui confère aux molécules ainsi obtenues un caractère T-dépendant et augmente leur immunogénicité.

15

Parmi les vaccins à base de polysides on compte à ce jour des vaccins contre les infections à *Neisseria meningitidis* groupe A, C, Y ou W 135 à *Streptococcus pneumoniae*, à *Haemophilus influenzae* type B et à *Salmonella typhi*.

20

Bien que les polysides antigéniques d'agents pathogènes soient potentiellement intéressants à titre d'immunogènes, leur emploi se révèle délicat en raison de l'importance de leur poids moléculaire moyen qui peut atteindre plusieurs millions d'équivalent-dextran. En particulier, lorsque l'on souhaite utiliser un polyside sous forme de conjugué, c'est-à-dire couplé à une protéine, on se heurte à des problèmes techniques difficiles à résoudre. Au cours du processus de couplage, un gel ou un floculat peut se former, rendant ainsi le conjugué difficile à stériliser par filtration.

25

Afin de surmonter cet écueil, on a déjà proposé de réduire la taille des polysides pour les rendre plus aisément manipulables. A cette fin, on a préconisé diverses méthodes de clivage. Ainsi il existe par exemple des méthodes bien établies telles que une fragmentation aux ultra-sons ou par hydrolyse en milieu acide, basique ou enzymatique. Toutefois, ces méthodes de fragmentation sont loin d'être satisfaisantes. En effet, elles conduisent trop souvent à la destruction totale ou partielle des épitopes caractéristiques par

35

perte de fonctions chimiques essentielles pour la spécificité antigénique.

5 Ainsi, l'hydrolyse acide ou basique du polyoside capsulaire de *S. typhi* ou de *N. meningitidis* groupe A élimine les groupements acétyles qui sont nécessaires à la spécificité antigénique du polyoside. De plus la réacétylation correcte des fragments obtenus par hydrolyse est très difficile sinon impossible.

10 D'autre part, avec la méthode de fragmentation par hydrolyse, il n'est pas toujours possible d'obtenir des fragments de taille relativement homogène, alors que la pratique pharmaceutique requiert des produits homogènes, de qualité constante et standardisée.

15 En ce qui concerne la fragmentation aux ultra-sons, on a par exemple montré que les groupements phosphates terminaux du polyoside d'*H. influenzae* type B sont perdus par traitement aux ultra-sons. Ceci peut laisser craindre que des groupements phosphates en position ramifiée sur les chaînes polyosidiques soient de même éliminés au cours d'un tel traitement.

20 En plus, bien que des fragments de taille relativement homogène puissent être obtenus aux ultra-sons, l'obtention de fragments de taille suffisamment faible par la méthode aux ultra-sons nécessite un temps de traitement très long, ce qui peut provoquer entre autres inconvénients, une détérioration rapide de l'appareillage. Son efficacité étant limitée, l'application
25 des ultra-sons à l'échelle industrielle est à exclure.

30 Finalement, l'utilisation de la dépolymérisation enzymatique des polyosides se limite aux polyosides pour lesquels des enzymes appropriées sont connues. Cet inconvénient majeur est toutefois inhérent au caractère hautement spécifique des enzymes vis à vis de leur substrat.

Pour le domaine vaccinal un progrès technique et économique important serait donc de pouvoir disposer d'un procédé de dépolymérisation qui ne présente plus les divers inconvénients des procédés de l'état de la technique.
35 En d'autres termes, il faudrait notamment pouvoir disposer d'un

procédé de dépolymérisation de polyosides antigéniques qui présente un ensemble de propriétés avantageuses parce que :

- 5 - Il permet d'obtenir des oligosides ayant un nombre d'unités osidiques réduit tout en conservant les déterminants structuraux essentiels d'au moins un épitope du polyoside à fragmenter.
- 10 - Il est possible de l'utiliser pour n'importe quelle structure polyosidique antigénique envisagée.
- 15 - Il permet d'obtenir des fragments de taille suffisamment homogène, et
- Il est d'un faible coût et d'une très grande simplicité de mise en oeuvre.

De manière surprenante, on a maintenant trouvé que ces objectifs sont atteints par une réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction.

20 Jusqu'à présent, une telle méthode, souvent désignée en langue anglaise sous le sigle ORD, a été mise en oeuvre pour fragmenter des polyosides tels que l'héparine, l'acide hyaluronique, le dextran et l'ADN et cela à des fins totalement différentes de celles poursuivies par la présente demande. Il s'agissait par exemple de réduire la viscosité des produits ou,
25 dans le cas d'une molécule linéaire telle que l'héparine d'obtenir des fragments de taille réduite dont il était connu qu'ils ont une activité anticoagulante différente. Bien entendu, comme les produits auxquels cette méthode était appliquée ne présentaient pas d'intérêt immunogénique, l'étude de l'intégrité des unités répétitives des fragments obtenus n'était pas
30 abordée.

D'autre part, il existe de nombreuses publications antérieures telles que par exemple, K. Uchida, Carbohydrate Research, (1988) 173 : 89-99 ; H. Uchiyama, Journal of Biological Chemistry, (1990) 265 : 7753-7759 ; S.W. Green,
35 The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry IB ; Academic Press

(1980) : 1132 ; A. Herp, The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry IB ; Academic Press (1980) : 1276 ; Kochetkov et al, Radiation Chemistry of Carbohydrates, Pergamon Press, Oxford, (1979) qui décrivent la réaction ORD comme destructrice soit des groupes phosphates, soit des cycles carbohydrates ;
5 par clivage des liaisons carbone-carbone du cycle.

L'impression d'ensemble qui s'est dégagée de l'état antérieur de la technique a fait que la réaction ORD est généralement reconnue comme destructive.

10

Rien ne laissait donc penser que l'ORD serait meilleure que par exemple la méthode par hydrolyse ou par traitement aux ultra-sons en vue des buts recherchés i.e., la conservation des épitopes.

15

C'est pourquoi, avant la présente invention il n'avait jamais été démontré qu'il était possible d'obtenir des oligosides, dont la structure de l'unité répétitive caractéristique est conservée, par fragmentation oxydo-réductive des polysides respectifs, afin de pouvoir les utiliser à titre d'agent actif dans des formulations permettant de renforcer les défenses immunitaires d'un individu.

20

On a maintenant découvert qu'il est possible de mettre en oeuvre la méthode ORD pour obtenir des oligosides ayant conservé au moins un déterminant antigénique du polyside de départ.

25

Par ailleurs, on a aussi constaté que la méthode de dépolymérisation par oxydo-réduction appliquée à un polyside antigénique permettait d'obtenir dans de bonnes conditions des fragments tout à fait satisfaisants du point de vue de l'homogénéité de la taille, malgré le fait qu'il est connu que la réaction
30 ORD est une réaction radicalaire clivant le polyside de manière aléatoire.

30

En conséquence, l'invention propose un oligoside ayant conservé au moins un déterminant antigénique d'un polyside antigénique issu d'un agent pathogène, caractérisé en ce qu'il est préparé par un procédé comprenant les
35 étapes consistant à (i) soumettre ledit polyside à une réaction de dépolymé-

35

risation par oxydo-réduction, (ii) récolter l'oligoside ainsi obtenu et, si désiré, (iii) le coupler à un partenaire de conjugaison ou à un porteur pour obtenir ledit oligoside sous la forme d'un conjugué ou lié à un porteur.

5 Par "oligoside", on entend un ensemble de molécules ; chaque molécule ayant un nombre réduit d'unités osidiques, par rapport au polyoside de départ, et contenant par exemple de 4 à 500 unités osidiques.

10 Le poids moléculaire moyen d'un oligoside est défini selon les règles explicitées ci-avant pour un polyoside. Généralement, un oligoside selon l'invention peut avoir une constante d'élution moyenne sur une colonne Sépharose 4BCL de 0,3 à 0,9, en particulier de 0,4 à 0,8, par exemple de 0,6 à 0,7. Autrement exprimé, un tel oligoside a un poids moléculaire moyen de 200.000 à 2.000 EqD, notamment de 150.000 à 10.000 EqD, en particulier de
15 60.000 à 30.000 EqD.

Selon un aspect préféré de la présente invention, le polyoside antigénique est un antigène de surface issu d'un agent pathogène qui peut être un champignon ainsi qu'une bactérie Gram-négative ou Gram-positive,
20 notamment du genre *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Neisseria*, *Shigella* ou *Haemophilus*.

L'agent pathogène bactérien est par exemple *Streptococcus pneumoniae*,
25 *Neisseria meningitidis*, *Salmonella typhi* ou *Haemophilus influenzae*.

L'agent pathogène fongique peut être une levure, plus particulièrement sélectionnée parmi les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Lipomyces*,
Rhinoctadiella et *Rhodotorula*.

30 Aux fins de la présente invention, une réaction d'oxydo-réduction est mise en oeuvre en présence d'au moins un système oxydo-réducteur qui peut être notamment sélectionné parmi des thiols e.g., glutathion, cystéine ; l'oxygène ; l'hydroquinone ; des ions de métaux à plusieurs valences, e.g., fer et cuivre ; l'acide ascorbique, le peroxyde d'hydrogène ; ces deux derniers
35 étant préférés.

Les différents paramètres expérimentaux qui peuvent influencer la cinétique de la réaction (concentration des produits, pH, température, temps de réaction) peuvent être facilement déterminés par l'homme du métier en fonction des caractéristiques du polyoside de départ, du système d'oxydo-réduction sélectionné, et de la taille moyenne des fragments qu'il souhaite obtenir. Lorsque ces fragments sont destinés notamment à des fins vaccinales, l'homme du métier prendra en particulier soin d'ajuster les différents paramètres de manière à obtenir des fragments d'une taille moyenne convenable, c'est-à-dire conservant un bon pouvoir antigénique et éventuellement adaptés à la mise en oeuvre de conjugués ; par exemple, d'un ordre de grandeur tel que précédemment indiqué. D'une manière générale, les conditions réactionnelles optimales peuvent être déterminées lors de tests de routine. A titre d'indication, on précise toutefois dans les exemples ci-après des valeurs expérimentales permettant d'obtenir de bons résultats.

Un polyoside destiné à être soumis à un procédé selon l'invention peut être extrait et purifié selon des méthodes connues, en particulier par précipitation à l'alcool ou au bromure de cétyltriméthylammonium ou par filtration sur gel. Pour une revue de ces méthodes, on se réfère en particulier à R.I. Whistler, in Methods in Carbohydrate Chemistry, (1965) I : 3-62.

Le polyoside est avantageusement préparé en solution aqueuse à une concentration de 5 mg/ml. On indique qu'une concentration avantageuse peut varier de 0,5 à 50 mg/ml, en particulier de 0,5 à 10 mg/ml. Une telle solution aqueuse est utilisable comme produit de départ.

Un système oxydo-réducteur tel que défini ci-dessus est ajouté à la préparation polyosidique en une seule fois ou de façon continue ou discontinue dans un rapport pondéral final système oxydo-réducteur : polyoside pouvant varier notamment de 0,01 à 10, en particulier de 0,1 à 5, par exemple de 0,1 à 1.

Un procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre à un pH de 3 à 8,5, en particulier de 3 à 6,5. De même, la température du milieu réactionnel n'est pas critique ; elle peut notamment varier de 4 à 60°C, en particulier de 18 à 40°C.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Le temps nécessaire pour parvenir à une fragmentation souhaitée du polyoside est généralement de 30 min à 1 h sauf cas particulier ; par exemple, pour le polyoside Vi de *S. typhi*, le temps de réaction est sensiblement plus long. Le temps de réaction peut être adapté en fonction de la taille des fragments que l'on souhaite obtenir.

Selon un mode de réalisation particulier, à une préparation aqueuse d'un polyoside ayant une concentration de 0,5 à 50 mg/ml, en particulier de 0,5 à 10 mg/ml, on ajoute de l'acide ascorbique jusqu'à une concentration finale de 0,01 à 25 mg/ml, en particulier de 0,1 à 10 mg/ml. L'oxygène naturellement dissous dans le milieu réactionnel est généralement suffisant ; si tel n'était pas le cas, on pourrait en injecter dans le milieu. Afin d'accélérer la réaction, on opère de préférence, en présence d'un sel soluble d'un métal à plusieurs degrés d'oxydation, tel que le fer ou le cuivre. Le ou les sel(s) métallique(s) peut(vent) être ajouté(s) à une concentration de 1 μ M à 100 mM, en particulier de 1 à 10 mM.

Selon un mode de réalisation alternatif à celui énoncé ci-dessus, on remplace l'acide ascorbique par du peroxyde d'hydrogène qui peut être ajouté jusqu'à une concentration de 0,1 à 100 mM, en particulier de 0,5 à 10 mM, éventuellement en présence d'un sel métallique.

Un oligoside préparé en soumettant un polyoside à une réaction de dépolymérisation par ORD est constitué d'un ensemble de molécules dont la constante d'élution moyenne est inférieure à celle du polyoside dont il dérive par fragmentation (la comparaison étant bien évidemment mise en oeuvre en utilisant une même colonne de chromatographie). L'oligoside peut être isolé selon une technique conventionnelle, par exemple par précipitation à l'aide d'un agent précipitant approprié e.g., acétone ou alcool, par filtration sur membrane ayant un seuil de séparation approprié, par chromatographie d'exclusion-diffusion ou d'échange d'ions. Par la suite, on peut aussi choisir de n'utiliser que certaines fractions de l'oligoside contenant des molécules ayant une constante d'élution égale à, ou aux alentours de la constante d'élution moyenne.

De manière optionnelle, l'oligoside selon l'invention peut être couplé par liaison covalente à un composé de nature peptidique, protéique ou à un autre polymère organique comme par exemple le polyacrylate pour former un conjugué capable de favoriser l'immunogénicité de l'oligoside notamment chez un mammifère. Le partenaire de conjugaison peut être notamment une protéine bactérienne, par exemple une toxine, l'anatoxine correspondante ou une sous-unité d'une toxine multimérique ainsi qu'une protéine de membrane, une sous-unité d'une protéine de membrane multimérique ou une protéine cytoplasmique. A titre d'exemple, on cite la toxine *Pertussis*, la toxine cholérique, la toxine tétanique et la toxine diphtérique. Ces protéines peuvent être extraites à partir des bactéries d'origine ou bien être obtenues par voie recombinante.

Une réaction de couplage, par liaison covalente, d'un oligoside avec un partenaire de conjugaison de façon à obtenir un conjugué utilisable en tant que vaccin peut être mise en oeuvre de manière conventionnelle. On peut par exemple faire apparaître sur l'oligoside une fonction capable de réagir avec un groupement fonctionnel du partenaire de conjugaison. On peut également faire réagir un agent de couplage bi-fonctionnel avec l'oligoside puis avec un partenaire de conjugaison, ou inversement. Pour une revue de ces diverses méthodes de couplage, on se réfère en particulier à W.E. Dick et M. Beurret, in *Conjugates Vaccines*, J.M. Cruse, R.E. Lewis Jr Eds, Contrib. Microbiol. Immunol. Basel, Karger, (1989) 10 : 48. Par ailleurs, le procédé de fragmentation par oxydo-réduction introduit des groupements réducteurs, notamment dans les oligosides dérivés des polyosides de *S. pneumoniae* type 6B et 19F, *H. influenzae* et *N. meningitidis* groupe A. Ceci permet donc d'utiliser la technique de conjugaison par amination réductrice.

L'immunogénicité d'un oligoside selon l'invention peut également être favorisée en utilisant des liposomes porteurs auxquels les oligosides sont liés de manière covalente. Favorisent également l'immunogénicité, des vecteurs, qui retiennent l'oligoside par incorporation à l'aide de forces ioniques ou hydrophobes, tels que par exemple les cyclodextrines, les liposomes et les iscoms.

L'invention concerne donc un oligoside tel que défini précédemment présenté

sous diverses formes, en particulier sous la forme d'un conjugué, ou couplé à un liposome porteur, ou incorporé dans un vecteur. Selon un aspect préféré de la présente invention, l'oligoside est sous forme de conjugué.

- 5 Un oligoside selon l'invention est notamment utile pour renforcer les défenses immunitaires d'un individu, chez les mammifères et notamment chez les humains, par exemple pour prévenir ou atténuer les effets d'une infection induite par un agent pathogène e.g., une infection bactérienne ou une mycose. Sont également utiles, les mélanges d'oligosides selon l'invention dérivés de
10 différents polysides antigéniques, ainsi que les mélanges d'un oligoside selon l'invention avec des agents actifs autres qu'un oligoside selon l'invention. De tels mélanges se prêtent à la préparation de vaccins polyvalents.

En conséquence, l'invention propose également :

15

- Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent actif au moins un oligoside selon l'invention ; la composition est notamment un vaccin ;
- 20 - L'usage thérapeutique d'un oligoside selon l'invention ;
- Une méthode pour renforcer les défenses immunitaires d'un individu e.g., de vaccination, qui comprend l'acte d'administrer, en quantité suffisante d'un point de vue thérapeutique, au moins un oligoside selon
25 l'invention, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement e.g., d'une telle vaccination ;
- L'utilisation d'un oligoside selon l'invention comme ingrédient actif dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à renforcer les
30 défenses immunitaires d'un individu ;
- Un procédé de préparation d'une composition pharmaceutique telle que définie précédemment, caractérisé par le fait que (i) on soumet le polyside de départ à une réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction, que
35 (ii), si désiré, soit, on couple l'oligoside obtenu avec un partenaire de

conjugaison ou un liposome, soit, on l'incorpore dans des liposomes, des iscoms ou des cyclo-dextrines et que (iii) l'on met le produit obtenu sous une forme pharmaceutique appropriée.

- 5 Une composition pharmaceutique préférée comprend au moins un oligoside sous forme de conjugué.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier on associe un oligoside selon
10 l'invention avec un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique, par exemple une solution saline physiologique apyrogène. En outre, une composition selon l'invention peut contenir des ingrédients usuels tel qu'un tampon, un agent conservateur ou stabilisant, un adjuvant et le cas échéant, un excipient de lyophilisation. Un oligoside selon l'invention peut être
15 conservé en présence d'un diluant, d'un support ou d'un ingrédient tel que précédemment évoqué. De manière alternative, un diluant, un support ou un ingrédient peut être ajouté juste avant emploi.

C'est pourquoi l'invention propose de manière alternative un kit
20 contenant :

- a) une composition pharmaceutique essentiellement constituée d'au moins un oligoside selon l'invention, à titre d'agent actif ;
- 25 b) une composition comprenant au moins un élément sélectionné parmi un diluant ou un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique, un composé ayant un pouvoir tampon, un agent conservateur ou stabilisant et un adjuvant ;
- 30 c) des instructions pour l'administration concomitante e.g., sous forme de mélange des compositions décrites sous a) et b).

Une composition selon l'invention peut être administrée par n'importe quelle voie conventionnelle, en particulier par voie sous-cutanée, par voie

intra-musculaire, par voie intra-veineuse, par exemple sous forme de suspension injectable ou par voie orale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. Le dosage approprié varie en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou du mode d'administration. On indique toutefois que de bons résultats peuvent être obtenus avec une dose unitaire de 1 à 200 µg d'oligoside sous un volume d'environ 0,5 ml.

L'invention est présentée plus en détail dans les exemples suivants et par référence aux Figures 1 à 4.

10

La Figure 1 présente les formules des unités répétitives du polyside capsulaire de *S. pneumoniae* type 14 (a), type 1 (b), de *S. typhi* (c), de *S. pneumoniae* type 6B (d), d'*H. influenzae* type B (e), de *S. pneumoniae* type 19F (f), de *N. meningitidis* groupe A (g), de *S. pneumoniae* type 18C (h), type 23F (i) *Klebsiella ozaenae* sérotype K4 (j), *Shigella flexneri* sérotype 1b (k) et *Cryptococcus neoformans* souche 98 (l). On remarque que (a) correspond à un polyside neutre, que (b) et (c) correspondent à des polysides possédant des acides uroniques dans la chaîne polysidique, que (d) à (i) correspondent à des polysides phosphorylés, que (j) et (k) correspondent à des lipopolysaccharides, respectivement anionique et neutre et que (l) correspond à un polyside fungique anionique.

20

Les Figures 2a et 2b représentent les profils d'élution des polysides non-fragmentés de *S. typhi* (2a) et de *S. pneumoniae* type 1 (2b) sur une colonne de Sépharose 4BCL. Les conditions de chromatographie sont comme suit : on applique sur la colonne de Sépharose préalablement équilibrée avec du NaCl 0,2 M, 2 ml d'une solution de polyside à 5 mg/ml. L'élution est mise en oeuvre avec du NaCl 0,2 M à une vitesse de 42 ml/h. Le profil d'élution est automatiquement analysé en mesurant la densité optique à 206 nm. En 2a et 2b, le volume mort de la colonne est de 76,56 ml tandis que le volume total est de 201,84 ml.

30

La Figure 3 représente une gamme-étalon de dextran de 500.000 à 20.000.

35

Les Figures 4a et 4b représentent les profils d'élution des

oligosides obtenus par fragmentation oxydo-réductive des polyosides de *S. typhi* (4a) et de *S. pneumoniae* type 1 (4b) sur une colonne de Sépharose 4BCL. Les conditions de chromatographie sont telles que précédemment énoncées dans la description de la Figure 2.

5

Exemple 1 : Fragmentation du polyoside Vi de *S. typhi* en présence d'acide ascorbique.

Une poudre sèche du polyoside Vi obtenue selon la méthode de Gotschlich et al, Prog. Immunobiol. Standard. (1972) 5 : 485 est reprise dans de l'eau apyrogène à raison de 1 mg/ml. Le poids moléculaire (PM) moyen du polyoside correspond à un K_D nul sur une colonne de Sépharose 4BCL.

A 500 ml de cette préparation pré-chauffée à 37°C, on ajoute lentement, en continu pendant 2 h, 12,5 ml d'une solution aqueuse contenant 100 mM d'acide ascorbique, 10 mM de $CuSO_4$ et 10 mM de $FeSO_4$; soit une concentration finale d'acide ascorbique de 0,44 mg/ml. Le pH du milieu réactionnel ainsi obtenu est d'environ pH 4. La réaction est poursuivie sous agitation douce environ 3 h (temps d'addition du réactif compris) à 37°C.

20

Le mélange réactionnel est ensuite filtré sur une membrane d'ultrafiltration 3K (seuil de coupure : 3 kilodaltons). Le rétentat est lavé une première fois avec une solution de NaCl 0,5 M, puis une seconde fois avec de l'eau. Le rétentat est repris dans environ 100 ml d'eau, puis lyophilisé pour conservation.

25

Le taux de clivage est de l'ordre de 95 % tel que calculé par intégration des courbes obtenues par filtration sur gel de Sépharose 4BCL (Figure 4.a). Par ailleurs, on estime le PM moyen de l'oligoside ainsi obtenu par la méthode de Granath & al (supra). Celui-ci, exprimé en constante d'élution moyenne est de l'ordre de 0,6, soit un PM de 60 000 EqD (en prenant pour référence le dextran).

30

L'analyse de l'oligoside en spectrométrie RMN (résonance magnétique nucléaire) indique clairement que la structure de l'unité répétitive

35

caractéristique du polyoside a été conservée après fragmentation. En particulier, il n'y a pas eu de perte de groupements fonctionnels ramifiés ou de sucres du squelette polyosidique.

5 Les fonctions chimiques caractéristiques de l'unité répétitive du polyoside Vi sont analysées par dosage colorimétrique. Le groupement O-acétyle en position ramifiée est dosé par la méthode de Hestrin, Biol. Chem. (1949) 188 : 249 tandis que le polyacide de la structure linéaire est dosé par la méthode de Stone et al, Clin. J. Microbiol. (1988) 28 : 719. Les dosages sont
10 effectués en parallèle sur du polyoside Vi non-fragmenté et sur l'oligoside formé.

Les rapports [O-acétyle] / [polyacide] mesurés pour le polyoside et l'oligoside sont identiques. Ceci montre bien que la méthode de fragmentation
15 du polyoside a permis de conserver la totalité des groupements O-acétyle labiles.

Exemple 2 : Fragmentation du polyoside Vi de *S.typhi* en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

20

Une poudre sèche du polyoside Vi obtenu selon la méthode de Gotschlich et al, (supra) est reprise en tampon phosphate 0,2 M pH 7,5 à raison de 0,4 mg/ml. Le PM du polyoside correspond à un K_D nul sur une colonne de Sépharose 4BCL.

25

A 100 ml de cette préparation pré-chauffée à 37°C, on ajoute lentement, sous agitation douce, 11 ml d'une solution aqueuse contenant 0,3 mg/ml d' H_2O_2 et 1,1 ml d'une solution de $CuSO_4$ à 2,6 mg/ml. La réaction est poursuivie sous agitation douce environ 1 h à 37° C.

30

L'expérience est renouvelée dans les mêmes conditions à l'exception du temps de réaction qui est de 2 heures au lieu d'une.

Dans les deux cas, chaque oligoside ainsi obtenu est ensuite recueilli et
35 purifié tel que décrit dans l'Exemple 1.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

De même, les caractéristiques des oligosides ainsi obtenus sont mises en évidence selon les méthodes citées dans l'Exemple 1. Les résultats sont comme suit :

- 5 - Dans les deux cas, le taux de clivage du polyside Vi est de l'ordre de 100 %.
- Le PM moyen des oligosides formés après une et deux heures correspond respectivement à un K_D de l'ordre de 0,7 et 0,8 ; soit 30.000 et 10.000 EqD.
- 10 - Dans les deux cas, on ne constate pas de modification dans la structure de l'unité répétitive.

15 Exemple 3 : Fragmentation du polyoside de *N. meningitidis*
 groupe A

Une poudre sèche du polyoside de *N. meningitidis* groupe A telle que obtenue par la méthode de Gotschlich et al (supra) est reprise en tampon phosphate 0,2 M pH 7,5 soit à raison de 1 mg/ml, soit à raison de 5 mg/ml. Le PM moyen du polyoside correspond à un K_D de 0,15 tel que mesuré sur une colonne de Sépharose 4BCL.

Les préparations à 1 et 5 mg/ml sont pré-chauffées à 37°C.

- 25
- 3a) A 100 ml de la préparation à 1 mg/ml, on ajoute 0,75 ml d'une solution réactionnelle contenant 100 mM d'acide ascorbique, 10 mM de CuSO_4 et 10 mM de FeSO_4 . La réaction est poursuivie sous agitation 1 h 30 à 37°C. Puis on ajoute à nouveau 0,75 ml de la
- 30 solution réactionnelle ; on obtient ainsi une concentration finale d'acide ascorbique de 0,26 mg/ml. La réaction est poursuivie à nouveau pendant 1 h 30 dans les mêmes conditions.
- 3b) A 100 ml de la préparation à 5 mg/ml, on ajoute 1,5 ml d'une
- 35 solution réactionnelle contenant 100 mM d'acide ascorbique,

10 mM de CuSO_4 et 10 mM de FeSO_4 ; soit une concentration finale d'acide ascorbique de 0,26 mg/ml. La réaction est poursuivie sous agitation 1 h 30 à 37°C.

5 Les oligosides obtenus en 3a) et 3b) sont recueillis et purifiés tel que décrit dans l'Exemple 1. De même, les analyses sont mises en oeuvre tel que mentionné dans l'Exemple 1. Dans les deux cas, on observe un taux de clivage de 100 %, sans détérioration de la structure de l'unité répétitive comme analysée par RMN. Le PM moyen de l'oligoside obtenu en 3a) correspond à un
10 K_D de 0,7 (soit 30.000 EqD) tandis que le PM moyen de l'oligoside obtenu en 3b) correspond à un K_D de l'ordre de 0,4 (soit 110.000 EqD).

L'ensemble de ces résultats indique qu'en faisant varier les conditions
15 expérimentales (concentration en polyside et en agent réactif oxydo-réducteur ainsi que le mode d'addition de l'agent réactif et le temps de réaction) on peut obtenir des oligosides de PM moyen substantiellement différent, tout en conservant un taux de clivage de 100%.

20 Enfin cet exemple ainsi que l'Exemple 2, montrent bien qu'il s'agit d'une fragmentation par oxydo-réduction et non par hydrolyse acide ou basique dans la mesure où cette fragmentation peut être mise en oeuvre à un pH proche de la neutralité.

25

Exemple 4 : Fragmentation du polyside de *S. pneumoniae* des types 1 et 19F et d'*H. influenzae* du type B, en milieu tamponné.

30

L'Exemple 3 (3a et 3b) est répété en utilisant les polysides de *S. pneumoniae* types 1 et 19F tels que obtenus selon la méthode décrite dans la demande de brevet française FR 2 495 939 publiée le 18 juin 1982 ainsi que le polyside d'*H. influenzae* type B obtenu selon la méthode de Gotschlich et al
35 (supra) ;

Les résultats sont comme suit :

Souche	PM moyen du polyside (exprimé en Ks)	Protocole a)		Protocole b)	
		PM moyen de l'oligoside	Taux de clivage	PM moyen de l'oligoside	Taux de clivage
<i>S.pneumoniae</i> 1	0,04	0,84	100	0,35	100
<i>S.pneumoniae</i> 19F	0,04	0,80	100	0,38	100
<i>N.influenzae</i> B	0,1	0,75	100	ND	ND

ND : non déterminé

L'analyse de l'oligoside en spectrométrie RMN (résonance magnétique nucléaire) indique clairement que la structure des unités répétitives caractéristiques des polysides a été conservée après fragmentation.

Exemple 5 : Fragmentation des polysides *N. meningitidis* groupe A et de *S. pneumoniae* types 1, 14, 18C, 19F et 23F en milieu non-tamponné.

Les préparations de polysides ainsi que les réactions sont mises en oeuvre comme décrit dans les Exemples 3 et 4 compte tenu des exceptions suivantes : (i) les préparations de polysides sont préparées à 5 mg/ml en eau apyrogène, (ii) la solution réactionnelle est ajoutée une seule fois à une concentration finale de 2,5 mg/ml et (iii) la réaction est poursuivie seulement pendant 1 heure.

Les oligosides obtenus sont recueillis et purifiés tel que décrit dans l'Exemple 1. Leurs caractéristiques sont évaluées

ainsi que mentionné dans l'Exemple 1. Le taux de clivage de chacun des polyosides est de 100 % sans qu'il y est détérioration de la structure des unités répétitives. Ce dernier point a également été mis en évidence par dosage colorimétrique : Les hexoses sont dosés par la méthode de Scott et al, Anal. Chem. (1953) 25 : 1650, les hexosamines par la méthode de Gatt et al, Anal. Biochem. (1965) 15 : 167, le rhamnose par la méthode de Dische et al, J. Biol. Chem. (1948) 175 : 595 et le phosphate par la méthode de Chen et al, Anal. Chem. (1956) 28 ; 1756. En ce qui concerne le polyoside de *S. pneumoniae* type 14 et l'oligoside qui en est dérivé par fragmentation, les rapports [hexose]/[hexosamine] sont substantiellement identiques. Il en est de même des rapports [rhamnose]/[hexose] et [phosphate]/[hexose] respectivement considérés dans le cas de *S. pneumoniae* types 18C et 23F.

L'analyse par spectrométrie RMN des oligosides ne met pas en évidence de signaux indiquant une hétérogénéité dans les unités répétitives et montre ainsi que les oligosides sont constitués d'une unité répétitive intacte.

Enfin, en ce qui concerne le PM moyen des oligosides, les résultats sont comme suit :

Souche	PM moyen du polyoside (exprimé en K _D)	PM moyen de l'oligoside (exprimé en K _D)
<i>N.meningitidis</i> A	0,15	0,66
<i>S.pneumoniae</i> 1	0,04	0,72
<i>S.pneumoniae</i> 14	0,01	0,72
<i>S.pneumoniae</i> 18C	0,03	0,75
<i>S.pneumoniae</i> 19F	0,04	0,67
<i>S.pneumoniae</i> 23F	0,07	0,57

Exemple 6 : Préparation d'un conjugué oligoside Vi de *S. typhi* / sous-unité B de la toxine cholérique.

5

6a) Introduction d'un groupe NH_2 sur l'oligoside Vi.

Un lyophilisat de l'oligoside Vi tel qu'obtenu dans l'Exemple 1 est repris dans un tampon phosphate pH 8 à raison de 10 mg/ml. A cette
10 préparation, on ajoute du diaminohexane et du NaCNBH_3 en solutions ; chacun à une concentration finale de 12,5 mg/ml. La réaction est poursuivie pendant 6 jours à température ambiante. La préparation est ensuite dialysée contre de l'eau et lyophilisée.

15

Par dosage selon la méthode de Shnyder et al, Anal. Biochem. (1975) 64 : 284, on contrôle que des groupes NH_2 ont bien été introduits. De même, par dosage selon Hestrin, on montre que les groupes O-acétyles sont toujours conservés.

20

6b) Introduction d'une fonction réactive.

Le lyophilisat obtenu en 6a) est repris en solution à raison de 40 mg/ml. A 20 ml de cette préparation, on ajoute 80 ml d'une solution à 40 mg/ml de disuccinimidyl subérate (DSS) en diméthylsulfoxyde (DMSO). La réaction
25 est poursuivie pendant une heure à température ambiante. La préparation est ensuite précipitée dans un mélange de DMSO/dioxane.

6c) Conjugaison.

30

Le précipitat obtenu en 6b) est repris dans une solution de NaCl 0,5 M à raison de 40 mg/ml. En parallèle, on prépare une solution de sous-unité B de la toxine cholérique (Tayot et al, Eur. J. Biochem. (1981) 113 : 249) en tampon phosphate 0,2 M pH 6,5 à raison de 10 mg/ml.

35

Les deux solutions ainsi préparées sont mélangées

ensemble. Le rapport pondéral oligoside/protéine est de 1 environ. La réaction est poursuivie à température ambiante pendant 15 heures.

5 6d) Purification.

Le mélange est ensuite filtré sur une minicassette d'ultrafiltration (Millipore) équipée d'une membrane dont le seuil de séparation est de 5.10⁴ daltons, afin d'éliminer la protéine et l'oligoside non-couplé. Le rétentat est
10 lavé en NaCl 0,3 M puis conservé à raison de 200 µg/ml en NaCl 8/1.000, merthiolate 1/10.000, à 4°C, après filtration stérile.

Exemple 7 : Préparation de conjugués oligoside/anatoxine
 tétanique.

15

On conjugue les oligosides tels qu'obtenus à partir des polysides de *S. pneumoniae* types 14 et 23F dans l'Exemple 5, ainsi que l'oligoside obtenu à partir du polyside Vi de *S.typhi* dans l'Exemple 1, en opérant de manière analogue au protocole reporté dans l'Exemple 6 et en remplaçant la sous-unité
20 B de la toxine cholérique par l'anatoxine tétanique préparée selon la méthode de Mueller et Miller, J. Bact. (1954) 67 : 671.

Les conjugués obtenus à partir d'oligosides de *S. pneumoniae* sont conservés à 250 µg/ml.

25

Exemple 8 : Mise en évidence du pouvoir immunogène des
 conjugués.

Des souris OF1 (Iffa Credo) sont réparties par lot de 8. Chaque souris d'un lot reçoit 0,5 ml d'une des solutions préparées aux Exemples 6 et 7 ou en
30 parallèle, 0,5ml des polysides natifs correspondants. Les injections s'effectuent par voie sous-cutanée. Ces injections sont répétées 14 jours après. En parallèle, un lot témoin reçoit uniquement de l'eau physiologique.

14 et 28 jours après la première injection, on effectue un prélèvement
35 sanguin et on titre les anticorps IgG anti-polyoside par dosage Elisa

(les plaques de titrage sont recouvertes de polyoside non-fragmenté). Le taux d'anticorps à 14 et 28 jours montre que les conjugués sont immunogènes. Dans chacun des cas, le taux d'anticorps est supérieur à celui induit par le polyoside natif correspondant. De plus on observe un effet rebond caractéristique d'un antigène T-dépendant.

Exemple 9 : Composition pharmaceutique vaccinale comprenant des conjugués à titre d'agents actifs.

Les conjugués oligosides Vi de S.typhi/anatoxine tétanique obtenus selon l'Exemple 7 sont formulés dans une dose vaccinale de 0,5 ml destinée à être injectée chez l'homme par voie sous-cutanée. La composition par dose étant :

- Oligosides Vi de S.typhi conjugués	10 µg
- Tampon phosphate à pH 7	475 µg (en ions PO_4)
- NaCl	4250 µg
- Merthiolate	0,05 µg
- Eau p.p.i.	qsp 0,5 ml

Revendications

- 5 1. Un oligoside ayant conservé au moins un déterminant antigénique d'un polyoside antigénique issu d'un agent pathogène, caractérisé en ce qu'il est préparé par un procédé comprenant les étapes consistant à (i) soumettre ledit polyoside à une réaction de dépolymérisation par oxydo-
10 réduction, (ii) récolter l'oligoside ainsi obtenu et, si désiré, (iii) le coupler à un partenaire de conjugaison ou à un porteur pour obtenir ledit oligoside sous la forme d'un conjugué ou lié à un porteur.
- 15 2. Un oligoside selon la revendication 1, ayant une constante d'élution moyenne telle que mesurée sur une colonne Sépharose 4BCL de 0,2 à 1.
3. Un oligoside selon la revendication 2, ayant une constante d'élution moyenne telle que mesurée sur une colonne Sépharose 4BCL de 0,4 à 0,8.
- 20 4. Un oligoside selon la revendication 3, ayant une constante d'élution moyenne telle que mesurée sur une colonne Sépharose 4BCL de 0,6 à 0,7.
- 25 5. Un oligoside selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le polyoside antigénique issu d'un agent pathogène est un polyoside capsulaire issu d'une bactérie pathogène.
6. Un oligoside selon la revendication 5, caractérisé en ce que la bactérie pathogène est sélectionnée parmi les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Neisseria* et *Haemophilus*.
- 30 7. Un oligoside selon la revendication 6, caractérisé en ce que la bactérie pathogène est sélectionnée parmi *S. typhi*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* et *H. influenzae*.
- 35 8. Un oligoside selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un conjugué.

9. Un oligoside selon la revendication 8, caractérisé en ce que le partenaire de conjugaison est sélectionné parmi un peptide, une protéine et un polymère organique.
- 5 10. Un oligoside selon la revendication 9, caractérisé en ce que le partenaire de conjugaison est sélectionné parmi une toxine *Pertussis*, une toxine cholérique, une toxine tétanique et une toxine diphtérique.
- 10 11. Un oligoside selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est incorporé dans un vecteur capable de favoriser l'immunogénicité chez un mammifère .
12. Un oligoside selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est incorporé dans des liposomes.
- 15 13. Un procédé de préparation d'un oligoside ayant conservé au moins un déterminant antigénique d'un polyside antigénique issu d'un agent pathogène, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à (i) soumettre ledit polyside antigénique à une réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction, (ii) récolter l'oligoside ainsi obtenu et, si désiré, (iii) le coupler à un partenaire de conjugaison ou à un porteur pour obtenir ledit oligoside sous la forme d'un conjugué ou lié à un porteur.
- 20 14. Un procédé de préparation selon la revendication 13, caractérisé en ce que la réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction se fait en présence d'un agent oxydo-réducteur qui est l'acide ascorbique ou le peroxyde d'hydrogène.
- 25 15. Un procédé de préparation selon la revendication 14, caractérisé en ce que la réaction de dépolymérisation par oxydo-réduction se fait en présence d'un agent oxydo-réducteur qui est l'acide ascorbique ou le peroxyde d'hydrogène et en présence d'un sel de fer ou de cuivre.
- 30 16. Une composition pharmaceutique qui comprend à titre d'agent actif au moins un oligoside selon l'une quelconque des revendications 1 à 12.
- 35

17. Une composition selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle constitue une composition vaccinale.
- 5 18. Utilisation d'un oligoside tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 12 comme ingrédient actif dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à renforcer les défenses immunitaires d'un individu, et en particulier à réaliser une vaccination.

1/6
FIGURE 1

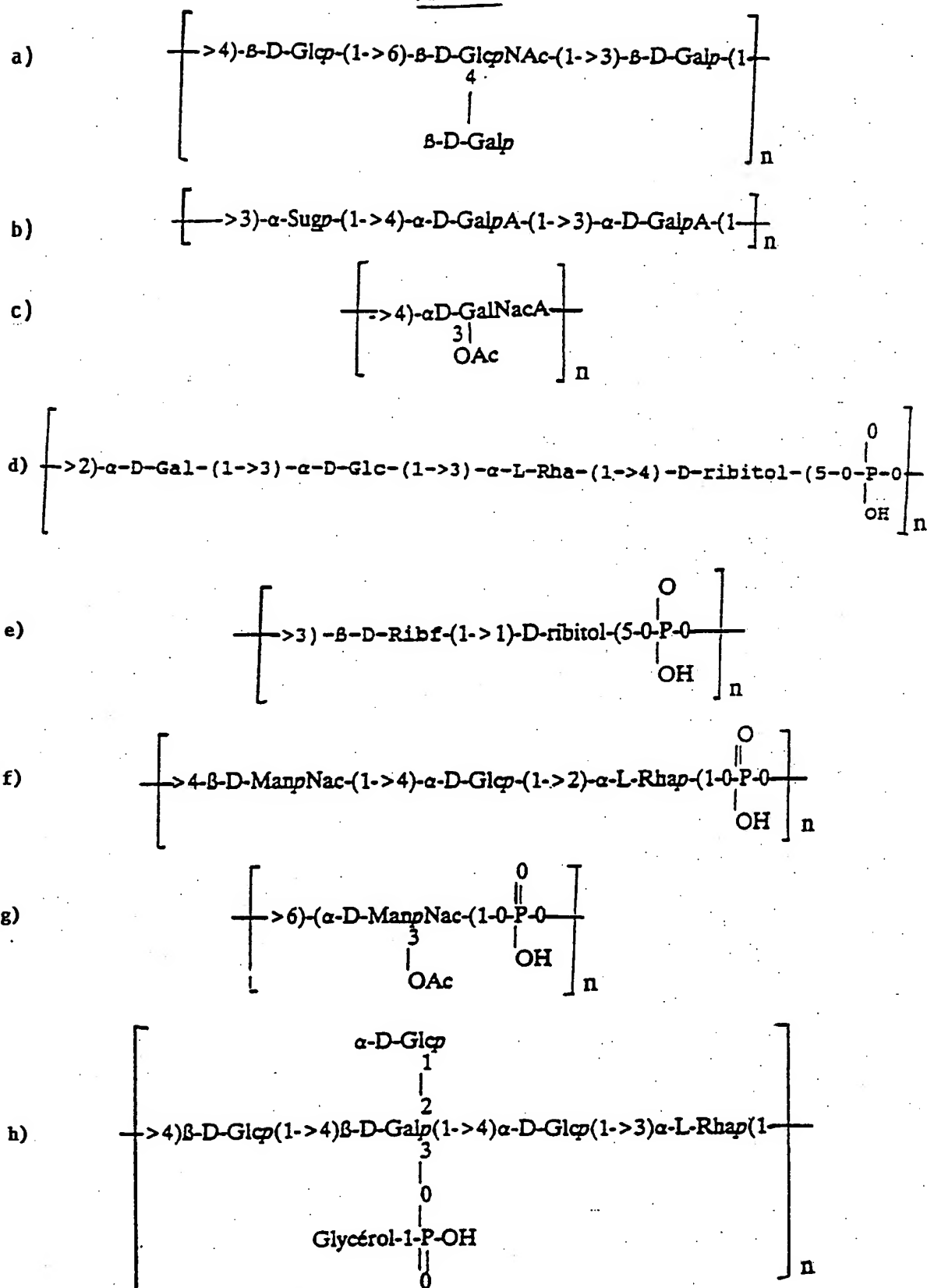


Figure 1 (continuation)

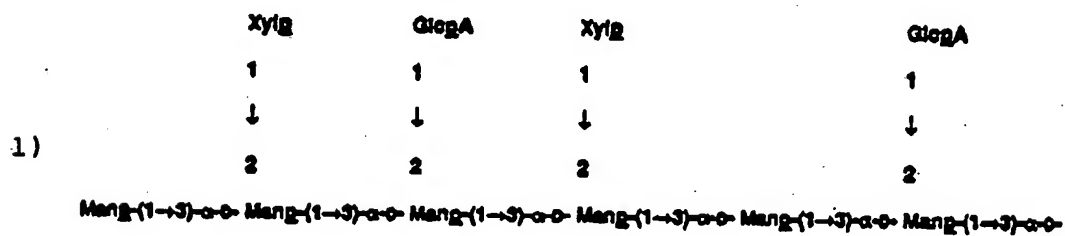
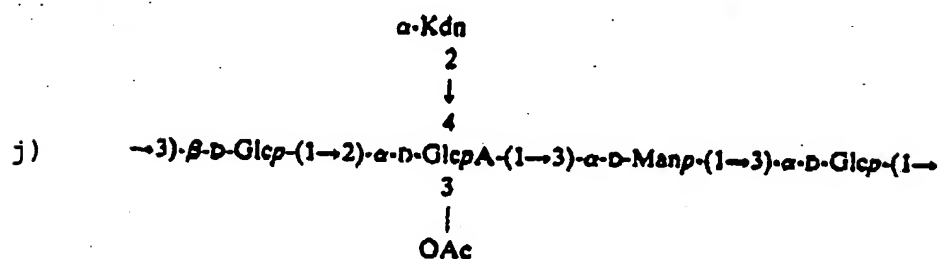
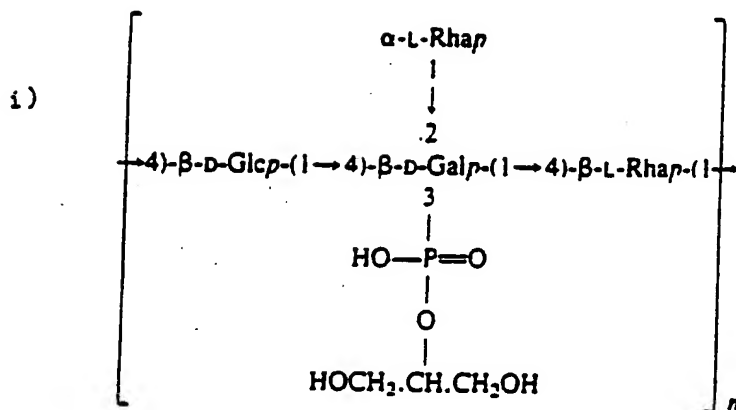
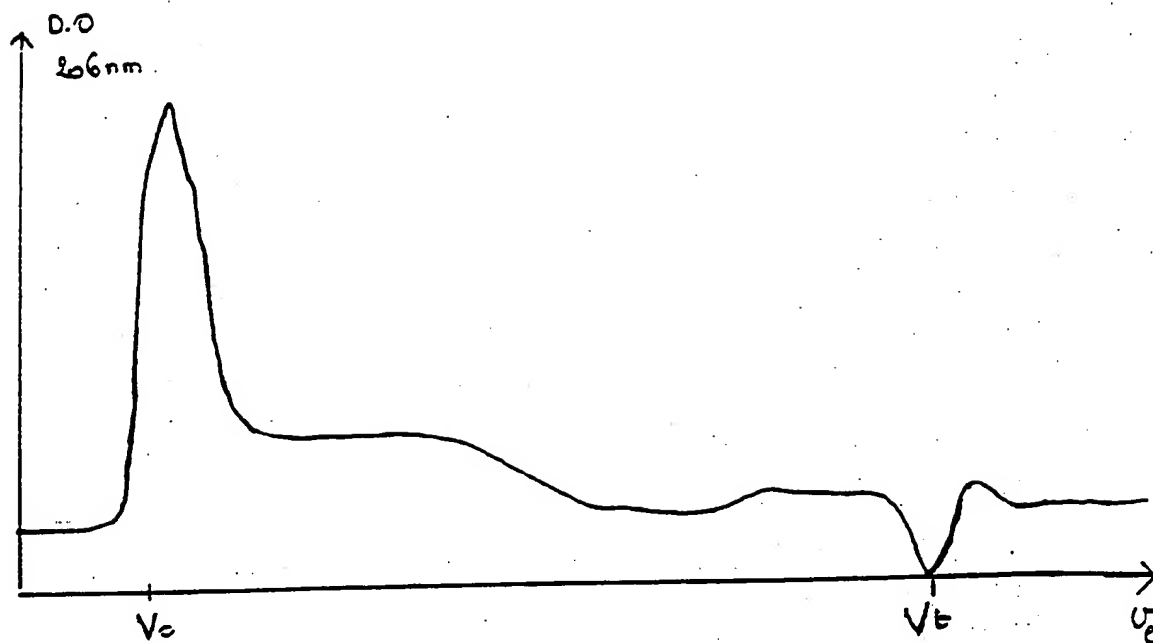
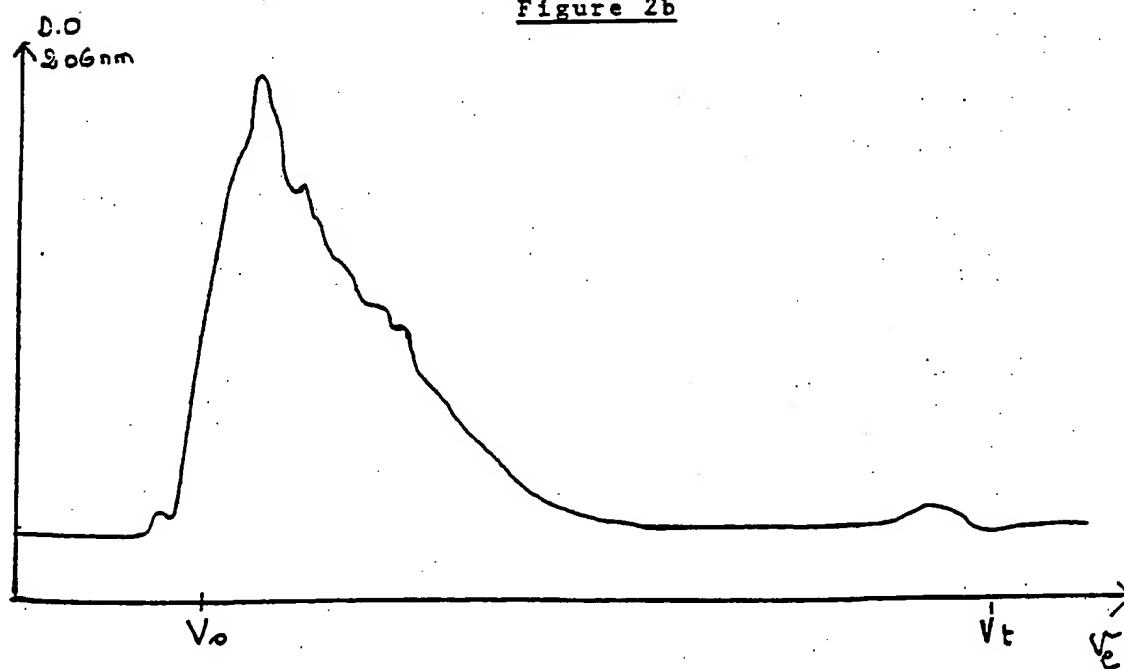
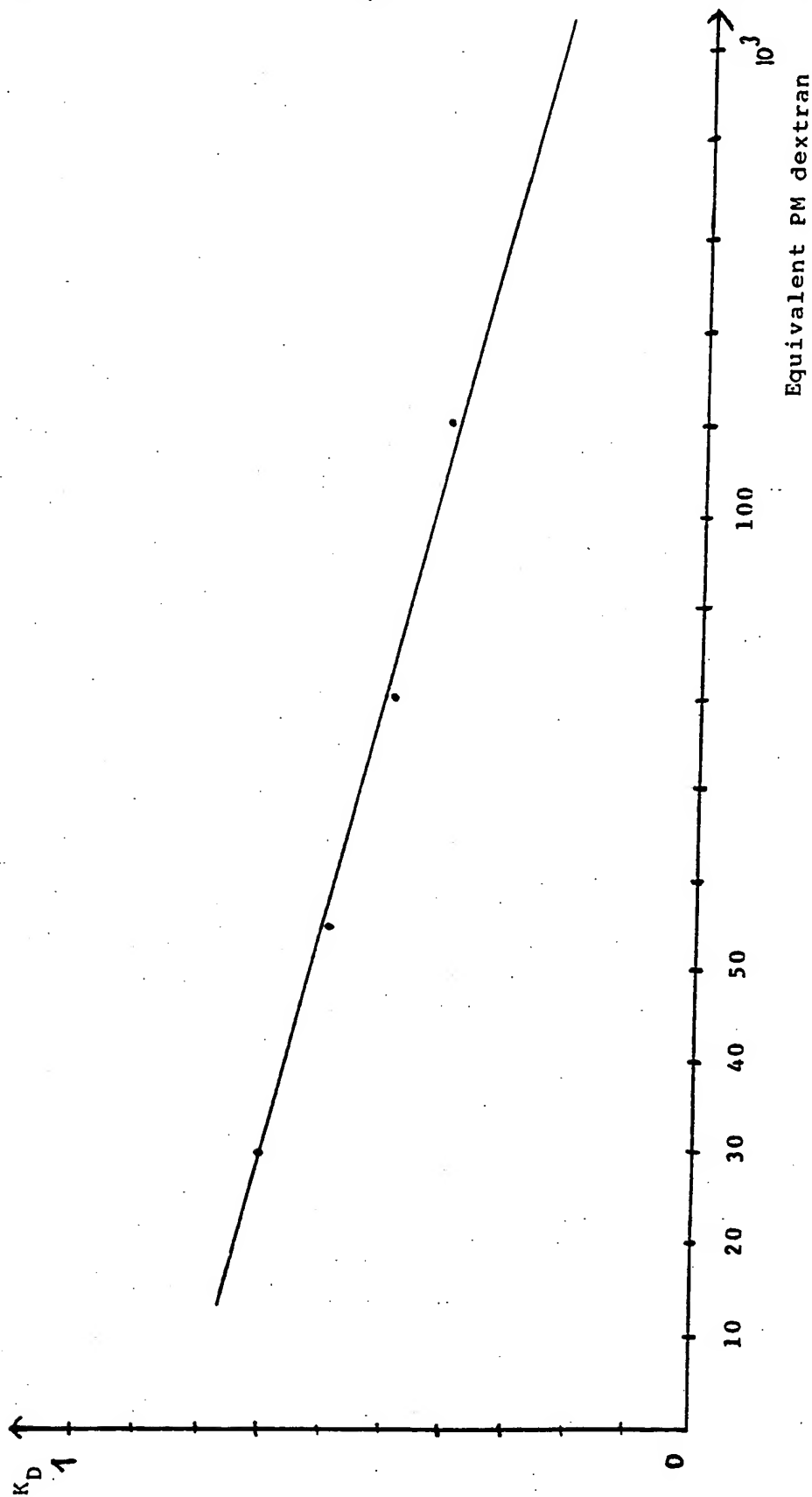


Figure 2aFigure 2b

SEPHAROSE 4BCL

FIGURE 3



5 / 6

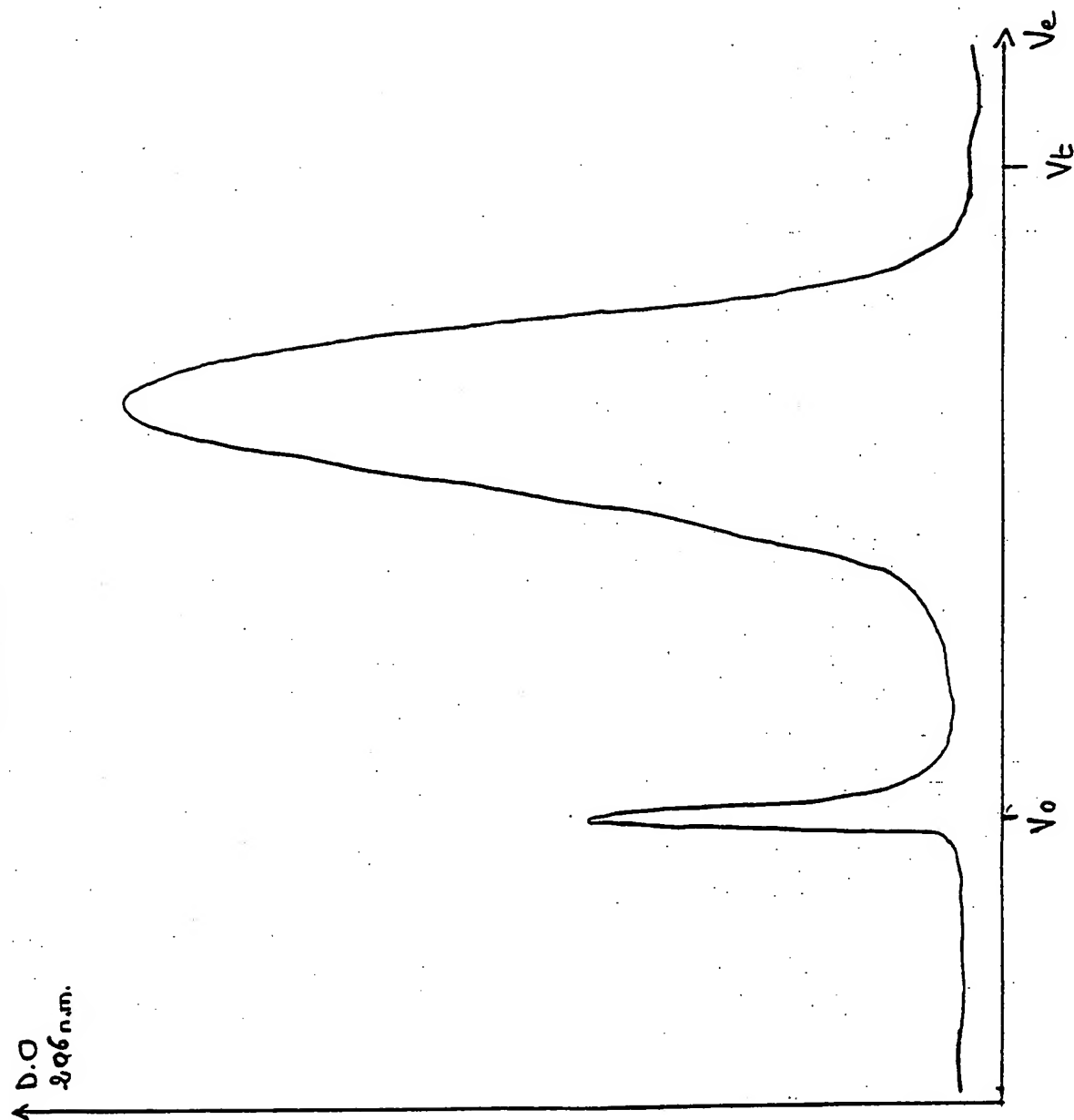
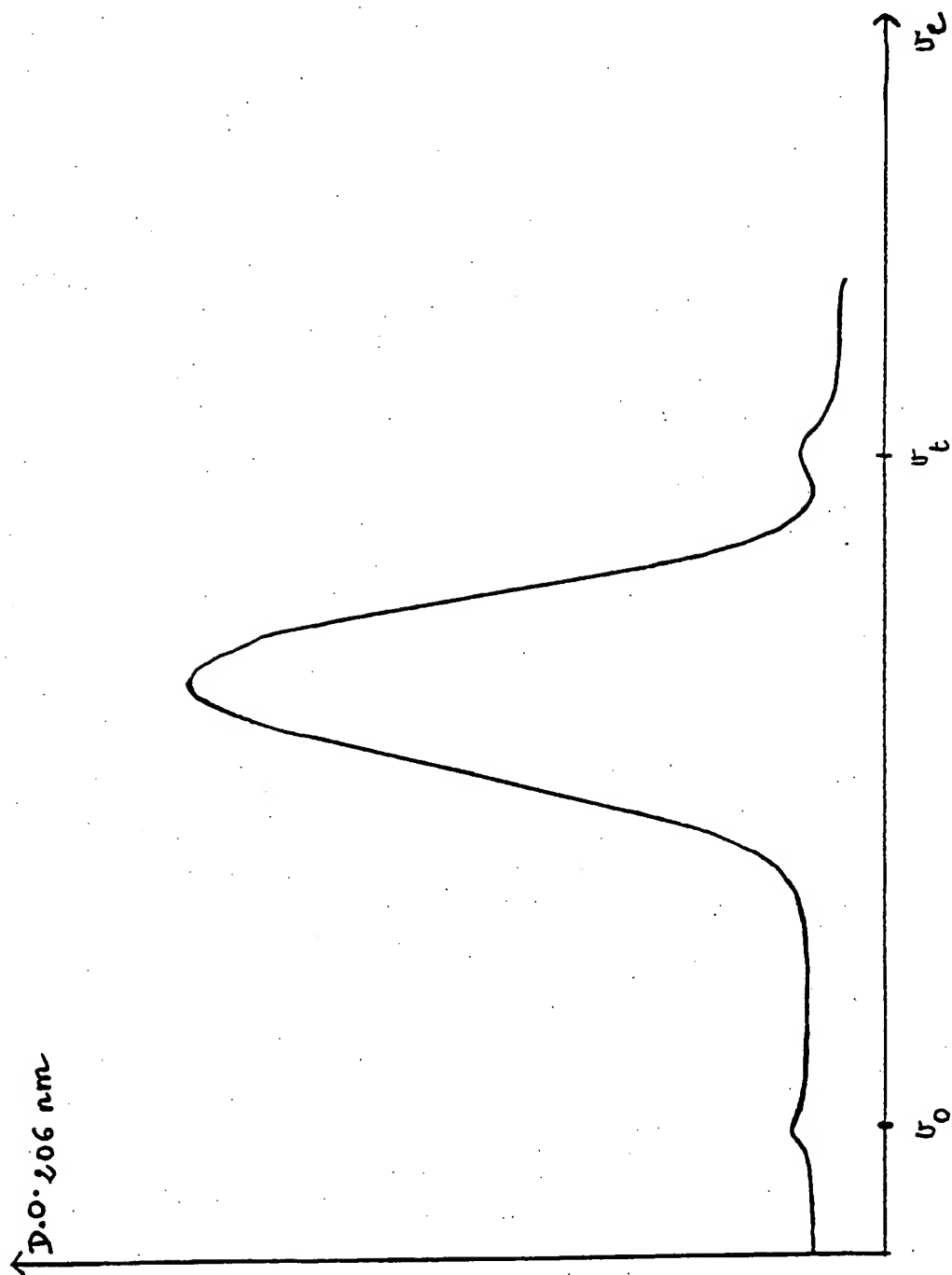
Figure 4a

Figure 4b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR92/00955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.:⁵ C08B37/00; A61K39/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.:⁵ C08B; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 50, No. 10, October 1986, TOKYO JP pages 2579 - 2583 K. UCHIDA ET S. KAWAKISHI "Oxidative depolymerisation of polysaccharides induced by the ascorbic acid-copper ion systems" see page 2579, column 2, line 10 - line 23 see page 2580, column 1, line 1 - line 10 see page 2581, column 1, line 12 - line 20 -----	1-18
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Vol. 265, No. 30, October 1990, BALTIMORE US pages 18278 - 18283 L.C. PAOLETTI ET AL. "An oligosaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine against type iii group b streptococcus" see abstract .../...	1-18

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

" Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 1993 (11.02.93)

Date of mailing of the international search report

23 February 1993 (23.02.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR92/00955

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>see page 18278, column 2, line 45 - page 18279, column 1, line 21</p> <p>see page 18279, column 2, line 3 - line 55</p> <p>see page 18280, column 1, line 11 - line 41</p> <p>see page 18280, column 2, line 44 - page 18281, column 1, line 55</p> <p>-----</p>	
Y	<p>EP,A,0 097 407 (RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT)</p> <p>4 January 1984</p> <p>see abstract</p> <p>-----</p>	1-18
A	<p>BE,A,1 000 118 (AJORCA) 5 April 1988</p> <p>see page 1, line 1 - line 4</p> <p>see page 3, line 1 - page 4, line 33</p> <p>-----</p>	13-15
A	<p>CARBOHYDRATE RESEARCH.</p> <p>Vol. 152, 1986, AMSTERDAM NL</p> <p>pages 7 -20</p> <p>S.C. SZU ET AL. "Ultrasonic irradiation of bacterial polysaccharides, characterization of the depolymerized products and some applications of the process"</p> <p>see abstract</p> <p>-----</p>	1,5-7
A	<p>EP,A,0 245 045 (PRAXIS BIOLOGICS INC.) 11 November 1987</p> <p>see page 4, line 20 - page 5, line 11</p> <p>see page 6, line 20 - page 7, line 30</p> <p>see page 8, line 25 - page 9, line 11</p> <p>see examples 10,11</p> <p>-----</p>	1,5-11, 16-18

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200955
SA 66610

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 11/02/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0097407	04-01-84	NL-A- 8202527	16-01-84
		WO-A- 8400109	19-01-84
BE-A-1000118	05-04-88	CH-A- 678326	30-08-91
		SU-A- 1639432	30-03-91
EP-A-0245045	11-11-87	US-A- 4902506	20-02-90
		AU-B- 601742	20-09-90
		AU-A- 7393587	01-12-87
		CA-A- 1276109	13-11-90
		JP-T- 1500036	12-01-89
		WO-A- 8706838	19-11-87
		US-A- 5097020	17-03-92

EPO FORM P007

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 92/00955

Demande Internationale No

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> CIB 5 C08B37/00; A61K39/02 </div>		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C08B ; A61K	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté ⁹		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ^o	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³	No. des revendications visées ¹⁴
Y	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 50, no. 10, Octobre 1986, TOKYO JP pages 2579 - 2583 K. UCHIDA ET S. KAWAKISHI 'Oxidative depolymerisation of polysaccharides induced by the ascorbic acid-copper ion systems' voir page 2579, colonne 2, ligne 10 - ligne 23 voir page 2580, colonne 1, ligne 1 - ligne 10 voir page 2581, colonne 1, ligne 12 - ligne 20 <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> --- -/-- </div>	1-18
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> ^o Catégories spéciales de documents cités:¹¹ "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée </div> <div style="width: 45%;"> "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier. "A" document qui fait partie de la même famille de brevets </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 FEVRIER 1993		23. 02. 93
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		MAZET J.-F.

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴			(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸	
Y	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 265, no. 30, Octobre 1990, BALTIMORE US pages 18278 - 18283 L.C. PAOLETTI ET AL. 'An oligosaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine against type iii group b streptococcus' voir abrégé voir page 18278, colonne 2, ligne 45 - page 18279, colonne 1, ligne 21 voir page 18279, colonne 2, ligne 3 - ligne 55 voir page 18280, colonne 1, ligne 11 - ligne 41 voir page 18280, colonne 2, ligne 44 - page 18281, colonne 1, ligne 55 ----	1-18	
Y	EP,A,0 097 407 (RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT) 4 Janvier 1984 voir abrégé ----	1-18	
A	BE,A,1 000 118 (AJORCA) 5 Avril 1988 voir page 1, ligne 1 - ligne 4 voir page 3, ligne 1 - page 4, ligne 33 ----	13-15	
A	CARBOHYDRATE RESEARCH. vol. 152, 1986, AMSTERDAM NL pages 7 - 20 S.C. SZU ET AL. 'Ultrasonic irradiation of bacterial polysaccharides, characterization of the depolymerized products and some applications of the process' voir abrégé ----	1,5-7	
A	EP,A,0 245 045 (PRAXIS BIOLOGICS INC.) 11 Novembre 1987 voir page 4, ligne 20 - page 5, ligne 11 voir page 6, ligne 20 - page 7, ligne 30 voir page 8, ligne 25 - page 9, ligne 11 voir exemples 10,11 -----	1,5-11, 16-18	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200955
SA 66610

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

11/02/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP-A-0097407	04-01-84	NL-A-	8202527	16-01-84
		WO-A-	8400109	19-01-84

BE-A-1000118	05-04-88	CH-A-	678326	30-08-91
		SU-A-	1639432	30-03-91

EP-A-0245045	11-11-87	US-A-	4902506	20-02-90
		AU-B-	601742	20-09-90
		AU-A-	7393587	01-12-87
		CA-A-	1276109	13-11-90
		JP-T-	1500036	12-01-89
		WO-A-	8706838	19-11-87
		US-A-	5097020	17-03-92

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82